

## 学位論文題名

## 先天性下垂体疾患の分子遺伝学的解析

## 学位論文内容の要旨

## [背景]

下垂体異常による先天性下垂体形成不全、成長ホルモン単独欠損症は早期診断、治療により良好な予後が期待できる。特に先天性下垂体形成不全の重症例では、成長ホルモン(GH; growth hormone), 甲状腺刺激ホルモン(TSH; thyroid-stimulating hormone), ゴナドトロピン(LH; luteinizing hormone, FSH; follicle-stimulating hormone), 副腎皮質刺激ホルモン(ACTH; adrenocorticotrophic hormone), プロラクチン(PRL; prolactin), それぞれの産生細胞全ての発生・分化が障害され、出生時から低血糖、循環不全をおこすため、迅速な診断、治療が必要である。

これらのホルモン産生細胞は前駆細胞から発生し、種々の特異的な転写調節因子の働きにより上記細胞に分化・増殖する。そのため下垂体形成に関わる転写遺伝子の異常は、関連するホルモンの分泌異常をひきおこす。現在までにヒト複合型下垂体前葉ホルモン欠損症(combined pituitary hormone deficiency; CPHD)の原因遺伝子として、*PROP1*, *POU1F1/PIT1*, *HESX1*, *LHX3*, *LHX4*などが同定されている。

*HESX1*は、ラトケ嚢発生初期に発現し、下垂体前葉の発達、視神経の発生を制御する転写抑制因子である。ノックアウトマウスの報告では、眼胞を含む中枢神経系の欠損と下垂体低形成を呈し、多くは致死性であった。*HESX1*は*PROP1*による遺伝子発現の増強を抑制するが、*Hesx1*ノックアウトマウスでは*Prop1*発現の量やタイミングの異常が報告されている。ヒトの*HESX1*遺伝子の異常は、septo-optic dysplasiaの兄弟例で初めて同定され、現在まで9家系13例で変異報告があり、GH単独欠損から、GH欠損を含むCPHDまで多彩である。

*LHX4*は下垂体発生初期に発現する転写因子である。ノックアウトマウスの報告ではラトケ嚢の発生と全ての下垂体前葉ホルモン産生細胞の分化・増殖が障害され、重症な下垂体の低形成を呈する。ヒトの*LHX4*遺伝子異常の報告は1家系4症例のみで、GH, TSH, ACTH欠損に加え、トルコ鞍低形成や小脳形成異常が特徴的とされる。

先天性の下垂体前葉ホルモン単独欠損症には、GH, ACTH, ゴナドトロピン, TSHそれぞれの単独欠損症があるが、その中で遺伝性GH単独欠損症(isolated growth hormone deficiency; IGHD)は常染色体劣性遺伝のIGHD I型と常染色体優性遺伝のII型に分類される。II型の多くは、*GH-1*遺伝子の第3イントロンのスプライシング変異で発症する。

[目的と方法] 当科で経験したCPHD患者においてその成因を探るため*HESX1*, *LHX4*遺伝子を解析し、同定した変異を*in vitro*の機能解析で評価した。またIGHDII型の1家系を経験し、*GH-1*遺伝子の異常、優性阻害効果のメカニズムについて検討した。

## [対象]

## (A) GHDを含むCPHD症例11例

このうち、生後早期より重篤な症状を呈した3例の経過を報告する。症例1: 現在6歳男児。在胎40週、正常経膈分娩で仮死なく出生、生後10時間で呼吸障害と著明な低血糖を認めた。小陰茎を呈し、精巣は触知できなかった。TSHの上昇しない甲状腺機能低下症を認め、MRIでは下垂体低形成、異所性後葉と左側視神経低形成を認めた。アルギニン、インスリン負荷にてGHの分泌は低下、GnRH負荷にてLH, FSHの分泌不全を認めた。症例2: 現在5歳女児。在胎37週、骨盤位のため帝王切開術で出生、生後30分で呼吸障害と著明な低血糖を認めた。TSHの上昇しない甲状腺機能低下症を認め、MRIでは下垂体はほぼ無形成、異所性後葉とキアリ奇形を認めた。GH分泌刺激試験では完全に無反応、GnRH負荷にてLH, FSHとも無反応だった。症例3: 現在17歳男児。在胎40週、正常経膈分娩にて仮死なく出生、生後12時間でチアノーゼ、低血糖を認めた。3歳まで無治療で経過したが、低血糖、身長増加速

度の低下，小陰茎を認め精査，GH 分泌刺激試験，GnRH 刺激試験で，GH，LH，FSH 全て無反応で，MRI にて下垂体低～無形成，異所性後葉を認めた。

(B) IGHD 症例 1 家系 (3 例)

現在 10 歳女兒。3 歳健診にて低身長を指摘，5 歳時に当科に紹介され精査を行なった。この時の身長は 86cm (-4.0SD) で，前額部突出，鞍鼻を認めた。患児の母の成人身長は 133cm で，小児期に GHD と診断されているが未治療である。血清 IGF-1，IGFBP-3 はいずれも低値で，GH 分泌刺激試験ではいずれも低反応であった。MRI で下垂体前葉の低形成を認めた。

[結果]

1) *HESX1* 遺伝子，*LHX4* 遺伝子の変異解析

症例 1 で，*HESX1* 遺伝子の新規変異 (306/307insAG) をヘテロで確認した。この変異は直後に終止コドン形成していた。症例 2 で，*LHX4* 遺伝子の新規変異 (P389T)，症例 3 で *LHX4* 遺伝子の新規変異 (V101A) をヘテロで確認した。症例 1-3 以外の症例では *HESX1* 遺伝子，*LHX4* 遺伝子いずれの変異も同定できなかった。

2) 変異 *HESX1* の機能解析

*Prop1* の導入で上昇した，*PIT1* 遺伝子のプロモーター活性は，野生型の *HESX1* の発現により有意に抑制されたが，変異 *HESX1* ではこの抑制効果は減弱した。*Pitx1* の導入で上昇した，*LHβ* 遺伝子のプロモーター活性は，野生型の *HESX1* の発現により有意に抑制されたが，変異 *HESX1* ではこの抑制効果は減弱した。*Pitx1* 下での *POMC* のプロモーター活性も，野生型の *HESX1* を発現することにより抑制され，変異 *HESX1* ではこの抑制効果が軽度減弱していた。

GFP 融合蛋白による細胞内局在の検討で，野生型及び R112G 変異の *HESX1* では，核内に存在したが，306/307insAG の変異体では核内移行を認めなかった。

3) 変異 *LHX4* の機能解析

野生型の *LHX4* の発現により *FSHβ* 遺伝子のプロモーター活性は上昇したが，V101A 変異では有意に減少した。P389T 変異では野生型に対して，変化を認めなかった。

4) *GH-1* 遺伝子の変異解析

*GH-1* 遺伝子の第 3 エクソンに E56X の変異をヘテロでそれぞれ同定した。

5) RT-PCR 法による変異 *GH-1* 遺伝子 (E56X) から産生される GH mRNA の検討

野生型と同サイズである 476 塩基の mRNA の他 431 塩基，356 塩基の mRNA が産生された。

[考察] 1) *HESX1* 遺伝子異常

プロモーターアッセイの結果では，*HESX1* の変異が *Prop1* や *Pitx1* などのさまざまな転写因子と相互に関連し，GH，PRL，TSH 産生のみならず，LH，ACTH の産生にも影響を与えることが示唆された。さらに 306/307insAG の変異 *HESX1* は核への存在が認められず，DNA 結合能の喪失が考えられた。

2) *LHX4* 遺伝子異常

*in vitro* の解析では，野生型で見られた活性増強効果が V101A の変異では消失していた。101 番目のバリンは LIM ドメインに存在し前後のアミノ酸配列は同じ LIM ドメインを持つ *LHX3* と共通で，種を超えてよく保存されている。このバリンは重要な機能を有することが予想され，本変異は CPHD 発症の成因と推定された。P389T の変異は，C 末端側の LIM 特異的ドメインに存在する。*in vitro* の解析では野生型と変化していなかったが，正常 100 アリールではなく，病因としての意義があると考えられる。

3) *GH-1* 遺伝子異常

IGHD II 型の多くは第 3 イントロンの変異だが，この場合第 3 エクソンをスキップした短い変異 GH が産生され，正常 GH の分泌を阻害することが示されている。そのメカニズムとして，分子量の小さい異常 GH 蛋白が分泌顆粒内で正常 GH とダイマーを形成し，正常 GH が下垂体細胞から分泌されないことによるものとされている。今回の RT-PCR 法による解析で，E56X の変異 *GH-1* 遺伝子から 3 種類の mRNA が産生された。356 塩基対のものは第 3 イントロンの変異によって生じる第 3 エクソンを欠失した mRNA と同一であった。したがって，この mRNA から産生された異常 GH 様蛋白が，正常アリールからの GH の分泌を阻害するものと考えられる。この mRNA の産生はラット下垂体由来細胞にても認められ，実際の GH 産生細胞で起きていることが推定される。

[結論]

1) 重症 CPHD では出生直後より重篤な症状を呈するため，早期診断，治療が必要である。

2) CPHD 患者より，*HESX1* 遺伝子の新規変異 1 例と *LHX4* 遺伝子の新規変異 2 例を同定した。*in vitro* の解析から，これらの変異は CPHD の原因であることが示唆された。

3) IGHDI 家系で, *GH-1* 遺伝子の新規変異を同定した. *in vitro* の解析から, この変異 GH により優性阻害を起こすことが示唆された.

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 正  
副 査 教 授 清 水 宏  
副 査 教 授 佐々木 秀 直

## 学位論文題名

### 先天性下垂体疾患の分子遺伝学的解析

先天性下垂体形成不全は、従来骨盤位分娩・仮死等が原因であったが、近年遺伝子異常による発症が報告されている。前葉ホルモン産生細胞は特異的な転写調節因子の働きにより発生・分化するため、転写遺伝子の異常は関連するホルモンの分泌異常をひきおこす。重症例では全ての前葉ホルモンを欠損し、出生時から呼吸不全・低血糖を呈し迅速な診断・治療を要する。*HESX1*、*LHX4* は共に、下垂体ホルモン複合欠損症 (combined pituitary hormone deficiency; CPHD) の原因遺伝子で、下垂体発生初期から重要な役割を果たすが未だ十分な解析は行われていない。今回先天性下垂体形成不全の成因解明のため、*HESX1*、*LHX4* に注目しその分子遺伝学的成因、臨床症状の特徴につき検討を行った。また GH 単独欠損症 (isolated growth hormone deficiency; IGHD) のうち常染色体優性遺伝形式を示す IGHD II 型の 1 家系につき成因の検討を行った。

まず CPHD に関して、当院受診の 11 例を対象とした。MRI にて多くが下垂体低形成・異所性後葉・柄形成不全を呈した。このうち生後早期より重篤な症状を呈した 3 例で遺伝子異常を同定した。

症例 1 は *HESX1* 異常の症例で現在 6 歳の男児である。出生時より呼吸不全と重症な低血糖、そしてゴナドトロピン分泌不全を示唆する小陰茎・精巣の形成不全を示した。内分泌検査では甲状腺ホルモン、コルチゾールの低値、GH は GHRH による刺激にて分泌を認めたが視床下部を介する負荷試験では分泌を認めなかった。MRI で下垂体低形成、異所性後葉と左側視神経低形成を認めた。本例で新奇変異 (306/307insAG) をヘテロで同定、直後に終止コドンを形成していた。PROP1 は PIT1 の転写活性を促進するが、*HESX1* はこの作用の抑制因子である。プロモーターアッセイの結果では今回同定した変異 *HESX1* はその機能抑制を喪失していた。また GFP 融合蛋白による細胞内局在の検討で、306/307insAG の変異体では核内移行を認めなかった。以上より本変異により DNA 結合能を喪失したものと考えられた。

症例 2, 3 は *LHX4* 異常の症例で、症例 2 は現在 5 歳の女児である。出生時より呼吸障害と著明な低血糖を認めた。下垂体前葉ホルモンの分泌はほとんど認められず、MRI で下垂体はほぼ無形成で異所性後葉とキアリ奇形を認めた。症例 3 は現在 17 歳の男児である。出生後にチアノーゼ、低血糖を認めた。症例 2 より軽症だが全ての下垂体前葉ホルモンの分泌不全を認め、MRI にて下垂体低形成、異所性後葉を認めた。症例 2 で新奇変異 (P389T) を、症

例3で新奇変異(V101A)をそれぞれヘテロで確認した。LHX4の結合部位が存在する*FSHβ*遺伝子プロモーターを用いた解析では、野生型で活性を増強させたが、V101Aではその増強効果が消失した。101番目のバリンはLIMドメインに位置し、そのアミノ酸配列はよく保存されている。LIMドメインは特異的に働くco-activatorの存在により、蛋白同士の相互作用としての機能を有すると考えられているが、V101Aではその作用障害により活性を低下させたものと考えられた。重症型のP389Tではプロモーター活性に対する効果は野生型と変化を認めなかった。変異の位置するC末のアミノ酸配列はLHX3、LHX4のみに認められ他の蛋白との相同性がない。その正確な役割は不明だが、正常100アミノ酸にこのアミノ酸置換は認められず、病因としての意義があると考えられた。

今回CPHDに加え、*HESX1*異常では視神経病変を、*LHX4*異常ではトルコ鞍形成不全を認めた。これらは逆に*HESX1*異常、*LHX4*異常を疑わせる特徴的所見であることを示唆した。

続いてIGHDⅡ型の症例である。現在10歳女児で、3歳健診にて低身長を指摘された。内分泌学的にはGHの単独欠損で、MRIで下垂体前葉の低形成を認めたが柄・後葉は正所性であった。母、妹もGHDでありIGHDⅡ型と診断された。本症例で*GH-1*遺伝子の新奇変異(E56X)をヘテロで同定した。IGHDⅡ型の多くはスプライシングの異常だが、初めて終止コドンへの変異を報告した。E56Xから産生されるGH mRNAの検討をRT-PCR法にて行ったところ野生型と同サイズである476塩基のmRNAの他、431塩基、そしてスプライシングの異常によって生じる356塩基のmRNAが産生された。この356塩基のmRNAにより、第3エクソンをスキップした短い変異GHが産生され、小胞体内で正常GHの分泌を阻害することが示されていることからE56Xにおける優性阻害が説明され、*GH-1*遺伝子の終止コドンへの変異がIGHDⅡ型を発症しうることを明らかにした。

公開発表に際し、副査の佐々木秀直教授から*HESX1*、*LHX4*異常症の先行研究について、発症例の両親の変異の有無、発症例が遺伝子多型でないとする根拠、脳の発生異常と遺伝子異常の関連について質問があった。次いで副査の清水宏教授からCPHD発症に関わる他の遺伝子異常の可能性、遺伝子の大きさは小さいが重要な機能を所持しているのかどうか、妊娠中にCPHDを予見できる可能性、重症CPHDに対する出生時からの具体的な診断・治療法に関する質問があった。また主査の有賀正教授から*LHX4*異常の重症度と機能解析の結果が乖離している点、ならびに異なる方法で機能解析ができないかに関して、IGHDの症例で遺伝子検索をするに至った経緯に関する質問があったが、いずれの質問に対しても申請者は妥当な回答をした。

本研究は新生児期より症状を示す重症CPHDでは下垂体発生に関わる転写遺伝子の異常が要因である可能性を示した点で高く評価され、今後の症例の蓄積からさらなる病態の把握、新たな治療への手がかりが得られることも期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。